



Europäisches Patentamt  
European Patent Office  
Office européen des brevets



⑪ Veröffentlichungsnummer: **0 534 304 A1**

⑫

## EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG

⑬ Anmeldenummer: **92115834.1**

⑮ Int. Cl.<sup>5</sup>: **A61K 31/785, C08G 73/04**

⑯ Anmeldetag: **16.09.92**

⑭ Priorität: **21.09.91 DE 4131507**

⑭ Anmelder: **HOECHST AKTIENGESELLSCHAFT**

**Brüningstrasse 50**

**W-6230 Frankfurt/Main 80(DE)**

⑮ Veröffentlichungstag der Anmeldung:  
**31.03.93 Patentblatt 93/13**

⑯ Erfinder: **Müllner, Stefan, Dr.**

**Friedrich-Ebert-Strasse 43**

**W-6203 Hochheim(DE)**

⑯ Erfinder: **Glombik, Heiner, Dr.**

**Südhang 16**

**W-6238 Hofheim am Taunus(DE)**

⑯ **Cycloalkylierte Polyethyleniminderivate und Ihre Verwendung als Hypolipidämika.**

⑯ Es werden unvernetzte, alkylierte Polyethylenimine beschrieben, die aufgrund ihrer gallensäurebindenden Eigenschaften als Hypolipidämika und Zusätze zu Lebensmitteln und Fruchtsäften verwendet werden können.

EP 0 534 304 A1

Ap6

Die Erfindung betrifft alkylierte Polyethyleniminderivate, ein Verfahren zu ihrer Herstellung, pharmazeutische Zubereitungen auf Basis dieser Verbindungen sowie ihre Verwendung als Arzneimittel, insbesondere zur Senkung erhöhter Lipidspiegel.

Unlösliche, basische, vernetzte Polymere werden seit geraumer Zeit zur Bindung von Gallensäure verwendet und aufgrund dieser Eigenschaften therapeutisch genutzt. Als Therapieobjekt werden die chologene Diarrhoe (z.B. nach Ileumresektion) und erhöhter Cholesterin-Blutspiegel kausal behandelt. Im letzten Fall handelt es sich um den Eingriff in den enterohepatischen Kreislauf, wobei anstelle des aus dem Kreislauf genommenen Gallensäureanteils die entsprechende Neusynthese aus Cholesterin in der Leber provoziert wird. Zur Deckung des Cholesterinbedarfs in der Leber wird auf das zirkulierende LDL (Low Density Lipoprotein)-Cholesterin zurückgegriffen, wobei die hepatischen LDL-Rezeptoren in vermehrter Anzahl zur Wirkung kommen. Die so erfolgte Beschleunigung des LDL-Katabolismus wirkt sich durch die Herabsetzung des atherogenen Cholesterinanteils im Blut aus.

Die als Arzneimittel in der Verwendung befindlichen Ionenautauscher besitzen als aktive Gruppen entweder quartäre Ammoniumgruppen (wie Colestyramin) oder sekundäre bzw. tertiäre Aminogruppen (wie Colestipol). Die Tagesdosis an Colestyramin beträgt zweckmäßigerweise 12 - 24 g, als Tageshöchstdosis werden 32 g empfohlen. 15 - 30 g ist die empfohlene tägliche Colestipol-Dosis. Geschmack, Geruch und hohe Dosierung erschweren die Patienten-Compliance. Die Nebenwirkungen gehen auf mangelnde Selektivität (z.B. Avitaminosen) zurück, die auch bei der Dosierung simultan gegebener Medikamente berücksichtigt werden müssen, aber auch auf Gallensäureverarmung, die verschiedene gastrointestinale Störungen (Obstipation, Steatorrhoe) unterschiedlichen Grades hervorrufen. Für beide Präparate wurde eine therapeutische Bedeutung durch Kombination mit anderen hypolipidäisch wirkenden Pharmaka wie Fibrate, HMG-CoA-Reduktase-Inhibitoren, Probucol (vgl. z.B. M.N. CAYEN, Pharmac. Ther. 29, 187 (1985) und 8th International Symposium on Atherosclerosis, Rome, Oct. 9-13, 1988, Abstracts S. 544, 608, 710)) beschrieben, wobei die erzielten Effekte auch die Therapie von schweren Hyperlipidämien ermöglichen. Deshalb erscheint es bedeutungsvoll, bei dem gegebenen Wirkprinzip, geeignete Stoffe ohne die Nachteile der gegenwärtig verwendeten Präparate zu finden.

Folgende Merkmale der genannten Präparate und insbesondere von Colestipol sind als verbesserungswürdig anzusehen:

1. Die hohen Tagesdosen, die zurückzuführen sind auf eine relativ geringe Bindungsrate bei neutralem pH in isotonem Medium und der (teilweisen) Wiederfreisetzung der adsorbierten Gallensäure.
2. Die qualitative Verschiebung der Gallensäurezusammensetzung der Galle mit abnehmender Tendenz für Chenodesoxycholsäure und die damit verbundene zunehmende Gefahr für Cholelithiasis.
3. Das Fehlen einer dämpfenden Wirkung auf den Cholesterinstoffwechsel der Darmbakterien.
4. Die zu hohe Bindungsrate von Vitaminen und Pharmaka macht einen Substitutionsbedarf an diesen Stoffen und Blutspiegelkontrollen eventuell notwendig.
5. Eine weitere Verbesserung kann in der Darreichungsform erzielt werden.

Die Behebung der aufgelisteten Mängel gelingt überraschenderweise durch die Anwendung hochmolekularer alkylierter Polyethylenimine. Die nicht resorbierbaren Makromoleküle entfalten ihre Wirkung sowohl in löslicher Form als auch pH-abhängig in unlöslicher Form, entsprechend der unvernetzten Struktur, als auch in unlöslichem Zustand als vernetzte Polymere.

Vernetzte Polyethylenimine werden in der US-Patentschrift 3 332 841 beschrieben. Die Vernetzung erfolgt u.a. über Alkylengruppen mit 2 bis 8 Kohlenstoffatomen, das Molekulargewicht der Ausgangspolymeren liegt zwischen 800 und 100 000. Zur Behandlung von vorübergehender Hyperacidität des Magens werden 0,25 bis 5 g pro Dosierungseinheit verabreicht. Es wird weder die Bindung von Gallensäure noch eine damit verbundene lipidsenkende Aktivität der vernetzten Polyethylenimine beschrieben, denn ohne Alkylierung besitzen die Polyethylenimine gegenüber den Gallensäuren je nach Typ keine oder nur unbedeutende Bindungskapazität. Durch die große potentielle Ladungsdichte kann durch die Alkylierung für die ausreichende Bindungskapazität und durch die Wahl der Substituenten von entsprechend hydrophil/hydrophobem Charakter für die Affinität und Bindungsspezifität gesorgt werden.

In der DE-A-39 01 527 (entsprechend US-Patentanmeldung Nr. 07/466,923 bzw. Nr. 07/762,177 und entsprechend EP-A-0 379 161) werden unvernetzte und vernetzte alkylierte Polyethyleniminderivate beschrieben, bei denen das Grundpolymer Molekulargewichte von 10 000 bis 10 000 000 aufweist und die Alkylierungsmittel der allgemeinen Formel R-X entsprechen, wobei X ein Halogen, Pseudohalogen oder halogen-ähnliche Verbindung ist, R ein geradkettiger oder verzweigter C<sub>1</sub>-C<sub>30</sub>-Alkylrest ist, und im Falle der vernetzten alkylierten Polyethylenimine das Vernetzungsmittel ein alpha, omega-Dihalogenalkan mit 2-10 Kohlenstoffatomen oder ein höher funktionelles Halogenalkan mit 2-10 Kohlenstoffatomen ist.

Aufgabe der Erfindung war es nun Gallensäureadsorber auf Polyethyleniminbasis bereitzustellen, die in verbesserter Weise in der Lage sind, erhöhte Cholesterinspiegel zu senken und eine erhöhte und

selektivere Bindung mit Gallensäure eingehen.

Überraschenderweise wurden nun gefunden, daß unvernetzte cycloalkylierte Polyethylenimine eines Molekulargewichtes von 10 000 bis 10 000 000, diese Aufgabe in hervorragender Weise erfüllen.

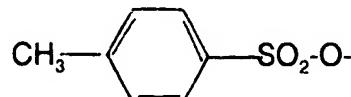
Gegenstand der Erfindung sind daher unvernetzte cycloalkylierte Polyethylenimine, herstellbar aus einem Ausgangspolyethylenimin eines Molekulargewichts von 10 000 bis 10 000 000 und einem Cycloalkylierungsmittel der Formel I

R-X (I)

10 worin

R ein Cycloalkylrest mit 5-30 Kohlenstoffatomen der monocyclisch, bicyclisch, tricyclisch, polycyclic und/oder verbrückt sein kann und  
X Chlor, Brom, Jod,  $\text{CH}_3\text{-SO}_2\text{-O-}$  oder

15



20

bedeutet.

Insbesondere bevorzugt sind unvernetzte Polyethylenimine, in denen R Cyclopentyl, Cyclohexyl, Cycloheptyl, Cyclooctyl, Cyclononyl, Cyclodecyl, bicyclische Systeme wie Decalyl, Hydrindanyl, verbrückte Systeme wie Norbornyl, oder polycyclische Systeme wie z.B. Cyclopantanoperhydrophenanthren und davon abgeleitete Ringsysteme oder Derivate bedeutet.

Gegenstand der Erfindung ist ebenso ein Verfahren zur Herstellung von unvernetzten Polyethyleniminen, dadurch gekennzeichnet, daß man nach in der Polymerchemie üblichen Methoden ein Polyethylenimin mit einem Molekulargewicht zwischen 10 000 und 10 000 000 mit einem Alkylierungsmittel der Formel R-X, worin X und R die angegebenen Bedeutungen haben, alkyliert.

30 Vorzugsweise werden Polyethylenimine mit einem Molekulargewicht über 100 000 eingesetzt.

In den Alkylierungsmitteln R-X ist X vorzugsweise Chlor oder Brom.

Das Verhältnis des eingesetzten Alkylierungsmittels zu den Aminogruppen des Polyethylenimins beträgt 0.2 : 1 bis 5 : 1, vorzugsweise 0.5 : 1 bis 2 : 1.

35 Durch die Reaktion mit Alkylierungsmittel wird ein Teil der sekundären Aminogruppen der Kette in tertiäre und quartäre Strukturen überführt. Die Bildung von tertiären Aminogruppen wird bevorzugt.

Gegenstand der Erfindung ist ebenso ein pharmazeutisches Präparat, welches eine oder mehrere der erfindungsgemäßen Polyethylenimine oder deren physiologisch verträgliche Salze einer Säure enthält.

Weiterhin betrifft die Erfindung die Verwendung der erfindungsgemäßen Verbindungen zur Herstellung eines Arzneimittels. Die Verbindungen können gelöst oder suspendiert in pharmakologisch unbedenklichen 40 organischen Lösungsmitteln, wie ein- oder mehrwertigen Alkoholen, z.B. Ethanol oder Glycerin, in Triacetin, Ölen, z.B. Sonnenblumenöl, Lebertran, Ethern, z.B. Diethylenglykoldimethylether, oder auch Polyethern, z.B. Polyethylenglykol, oder auch in Gegenwart anderer pharmakologisch unbedenklicher Polymerträger, wie z.B. Polyvinylpyrrolidon, oder anderen pharmazeutisch annehmbaren Zusatzstoffen wie Lactose, Stärke, Gelatine, Cyclodextrin, Talkum oder Polysacchariden angewendet werden. In fester Form anfallende

45 Wirkstoffe werden zunächst z.B. durch Feinmahlung auf eine gewünschte Partikelgröße gebracht. Ferner können die erfindungsgemäßen Verbindungen in Kombination mit anderen Arzneistoffen gegeben werden, z.B. mit HMG-CoA-Reduktasehemmern, Vitaminen, Geriatrika und Antidiabetika.

Die erfindungsgemäßen Verbindungen werden in verschiedenen Dosierungsformen verabreicht, vorzugsweise oral in Form von Tabletten, emulgierbare Zubereitungen, Kapseln oder Flüssigkeiten, wie z.B. 50 auch Lebensmitteln oder Fruchtsäften.

Die erfindungsgemäßen Verbindungen können verwendet werden als Arzneimittel, insbesondere zur Hemmung der Gallensäurerückresorption im Darm und als Hypolipidämikum und bei allen Erkrankungen, bei denen erhöhte Gallensäure-Konzentrationen im Darm oder Serum auftreten.

Ebenso können die erfindungsgemäßen Verbindungen verwendet werden als Zusatz in Lebensmitteln, 55 insbesondere in Fruchtsäften, Brot usw. oder zusammen mit diesen eingenommen werden.

Zu den Gallensäuren zählen natürliche Gallensäuren, Derivate der natürlichen Gallensäuren und deren Alkali- bzw. Erdalkalisalze. Insbesondere zählen hierzu: Glycocholat, Taurocholat, Cholat, Cholsäure, Desoxy-, Chenodesoxy-, Ursodesoxy- und Lithocholsäure sowie deren Konjugate mit Glycin oder Taurin.

Zusätzlich kann auch Cholesterin adsorbiert werden.

Unter Serum wird insbesondere Human- oder Animal-Serum verstanden.

Die erfindungsgemäßen alkylierten Polyethylenimine adsorbieren körpereigene Säuren, insbesondere Gallensäuren. Aufgrund dieser Eigenschaften sind sie in der Lage erhöhte Cholesterinspiegel zu senken.

5 Die erfindungsgemäßen alkylierten Polyethylenimine besitzen gegenüber Colestipol wesentlich günstigere gallensäureadsorbierende Eigenschaften wie aus den nachstehenden beschriebenen Versuchen erkennbar ist.

Hinsichtlich der Verträglichkeit und der Selektivität der Gallensäurebindung, sowie der simultanen Cholesterinbindung, zeigt sich sowohl in-vitro- als auch in-vivo-Versuchen in Wistar-Ratten eine deutliche

10 Überlegenheit (soft-gel-Charakteristik).

Figur 6 zeigt die pH-Abhängigkeit der Gallensäurebindung, welche über den physiologischen pH-Bereich nahezu Konstant bleibt und erst oberhalb pH 8 nachläßt.

Diese Eigenschaften des unvernetzten alkylierten Polymers gewährleisten sowohl im Magen (Gallenflüssigkeit-Reflux bei Lebererkrankungen) als auch in leicht basischem Medium des Dünndarms,

15 sowie in der leicht aciden Umgebung im Mastdarm eine gute bis optimale Gallensäurebindung.

#### Beispiel

4,3 g (0,1 mol) Polyethylenimin (in 50 % wässriger Lösung) werden mit 100 ml Wasser verdünnt und mit

20 23,7 g (0,2 mol) Chlorcyclohexan 24 h unter starkem Rühren zum Rückfluß erhitzt. Nach kurzer Abkühlung gibt man 100 ml 2N NaOH hinzu und erhitzt erneut 24 h zum Rückfluß.

Die organische Phase wird abgetrennt. Die wässrige Phase wird mit Dichlormethan gewaschen und am rotationsverdampfer und danach im Ölpumpenvakuum eingeengt. Der Rückstand wird aus wässriger Lösung dialysiert.

25 Nach Entfernen des Wassers (Rotationsverdampfer, Ölpumpenvakuum Gefriertrocknung) erhält man das mit Cyclohexan substituierte Polyethylenimin als schwach gelbliches Pulver (Charakterisierung durch Elementaranalyse).

#### 1. In vitro Versuche

30 Die In-vitro-Versuche zur Überprüfung der Bindungseigenschaften von den erfindungsgemäßen Verbindungen wurden in einem eigens dafür entwickelten Rindergalle-Assay überprüft. Es wurde nämlich gefunden, daß die Bindungsaffinität und Kapazität von Gallensäure-Adsorbentien durch Ioneneinflüsse und pH-Wert (Figur 6) stark differieren kann und auch abhängig vom jeweiligen Inkubationsmedium ist. Von der 35 allgemeinen Zusammensetzung ist Rindergalle sehr ähnlich der Humangalle und in reproduzierbarer Qualität sowie in ausreichender Quantität erhältlich. Wegen der Nähe zu den im Duodenum herrschenden physiologischen Bedingungen und der zu erwartenden besseren Übertragbarkeit der In-vitro-Daten auf die 40 Tierversuchsdaten bzw. klinischen Daten, wurde daher anstatt des sonst üblichen Bindungstests von käuflichen, reinen Gallensäure in reinem physiologischen Puffer ein Bindungsassay auf Rindergalle-Basis entwickelt. Die Figuren 1 bis 5 zeigen die Auswertung des Adsorbertests in Rindergalle mit entsprechender UV-HPLC, Fluoreszenz-HPLC und TLC-Auswertung. Verglichen werden Adsorber aus der DE-A-3 901 527 (Beispiel 2) mit der erfindungsgemäßen Substanz aus Beispiel 1.

#### Legende zu den Figuren 1 bis 6

45 Figur 1

Das Diagramm zeigt die HPLC-Analyse (UV-Detektion) des Bindungsverhaltens der Verbindung gemäß Beispiel 1 der Erfindung und der Verbindung gemäß Beispiel 2 aus DE-A-3 901 527 (Vergleichsverbindung).

50 Der Überstand der verdünnten Rindergalle (1:10 mit 50 mM NaHCO<sub>3</sub>, pH 6,5) wurde nach 24 h Inkubation (bei 37 °C) von 10 mg/ml Gallensäure-Sequestrants analysiert.

Die Ergebnisse sind in Form von gebundener Gallensäure/g Adsorber dargestellt.

55 Figur 2

Das Diagramm zeigt die HPLC-Analyse (UV-Detektion) des Bindungsverhaltens der Verbindung nach Beispiel 1 der Erfindung, der Verbindung gemäß Beispiel 2 aus DE-A-3 901 527 und von kommerziell

erhältlichem Colestipol.

Der Überstand der verdünnten Rindergalle (1:10 mit 50 mM NaHCO<sub>3</sub>, pH 6,5) wurde nach 24 h Inkubation (bei 37 °C) von 10 mg/ml Gallensäure-Sequestrants analysiert.

Die Ergebnisse sind in % gebundene Gallensäure (Taurocholat und Glykocholat) dargestellt.

5

Figur 3

Das Diagramm zeigt die TLC (Dünnschicht-Chromatographie) Analyse (Fluoreszenz-Scan) des Bindungsverhaltens der Verbindung nach Beispiel 1 der Erfindung und der Verbindung gemäß Beispiel 2 aus

10 DE-A-3 901 527 (Vergleichsverbindung).

Der Überstand der verdünnten Rindergalle (1:10 mit 50 mM NaHCO<sub>3</sub>, pH 6,5) wurde nach 24 h Inkubation (bei 37 °C) von 10 mg/ml Gallensäure-Sequestrants analysiert.

Die Ergebnisse sind als % gebundene Gallensäure (Cholat, Taurocholat und Glykocholat) dargestellt.

15 Figur 4

Das Diagramm zeigt die HPLC-Analyse (Fluoreszenzdetektion) des Bindungsverhaltens der Verbindung nach Beispiel 1 der Erfindung und der Verbindung gemäß Beispiel 2 aus DE-A-3 901 527 (Vergleichsverbindung).

20 Der Überstand der verdünnten Rindergalle (1:10 mit 50 mM NaHCO<sub>3</sub>, pH 6,5) wurde nach 24 h Inkubation (bei 37 °C) von 10 mg/ml Gallensäure-Sequestrants analysiert.

Die Ergebnisse sind als % gebundene Gallensäure (Cholat und Glykocholat) dargestellt.

Figur 5

25

Das Diagramm zeigt die Mittelwerte aller Analysen (Figuren 2, 3 und 4). Das Bindungsverhalten der Verbindung nach Beispiel 1 der Erfindung ist demjenigen der Verbindung gemäß Beispiel 2 aus DE-A-3 901 527 gegenübergestellt.

30 Figur 6

Das Diagramm zeigt die pH-Abhängigkeit der Gallensäure-Bindung der Verbindung nach Beispiel 1 der Erfindung.

Der Überstand der verdünnten Rindergalle (1:10 mit 50 mM NaHCO<sub>3</sub>, pH 6,5) wurde nach 24 h Inkubation (bei 37 °C) von 10 mg/ml Gallensäure-Sequestrants analysiert.

35 Die Ergebnisse sind als % gebundene Gallensäure (Taurocholat und Glykocholat) dargestellt und wurden mit HPLC (UV-Detektion) ermittelt.

#### Testaufbau mit Rindergalle

40

- Rindergalle (vom Schlachthof, mit Zusatz von 0,02 % Natriumazid, aufbewahrt im Kühlschrank bei + 4 °C) wird 1:10 mit Natriumbicarbonat-Puffer 50 mM, pH 6,5 verdünnt. Dadurch soll eine weitgehende Anpassung an die im Dünndarm herrschenden Verhältnisse erreicht werden (Information von Prof. A.F. Hoffman, University of California, San Diego, USA: 90 % der durch Gallensäureadsorber gebundenen Substanzen sind keine Gallensäuren, sondern vorwiegend Hydrogencarbonat.). Der pH-Wert von 6,5 entspricht dem der unverdünnten Rindergalle.
- Je 100 mg der zu testenden Adsorber werden in Erlenmeyerkolben mit Schliff eingewogen.
- Nach Zugabe von 10 ml der Galle-Puffer-Mischung werden die Ansätze verschlossen und in einem Schüttelwasserbad 24 h bei 37 °C inkubiert.
- Zu jedem Test gehören zwei Kontrollansätze ohne Präparatezugabe und zwei Standardansätze mit Colestipol (reiner Wirkstoff). Pro Präparat wird eine Doppelbestimmung durchgeführt.
- Nach der Inkubation werden die Proben in Zentrifugenröhren umgefüllt und 10 min bei 6000 rpm abzentrifugiert.
- Der Überstand wird abgenommen und wie folgt analysiert:

55

## a.) Enzymatische Bestimmung der Gesamtgallensäure

- In Eppendorfgefäß werden je 900 µl des folgenden Gemisches gegeben:
  - 6 ml Tetra-Natrium-Diphosphat-Puffer 0,1 M, pH 8,9
  - 5 2 ml NAD-Lösung (4 mg/ml Wasser)
  - 20 ml ®Millipore-Wasser
- Dazu werden 30 µl der Probe und 30 µl Enzymlösung pipettiert
- Enzymlösung: 3-alpha-Hydroxysteroiddehydrogenase 0,5 units/ml
- Die Ansätze werden gemischt und 2 h bei Raumtemperatur inkubiert.
- 10 - Anschließend Umfüllen in 1 ml-Einmalküvetten und Messung im Photometer bei 340 nm.
- Für Galleproben nur bedingt geeignet, da die grüne Farbe stört.

## b.) TLC mit Scannerauswertung und Fotografie (Einzelgallensäuren und Cholesterin)

- 15 TLC-Platten: Kieselgel 60-DC Fertigplatten, 20 x 20 cm, Schichtdicke 0,5 mm, mit Konzentriierungszone von Merck, Art. Nr. 11845
- Laufmittel: Chloroform : Methanol : Eisessig 85:20:8
- Färbereagenz: Mangan-II-Chlorid / Schwefelsäure
- Färbezeit: ca. 20 min bei 120 °C im Trockenschrank
- 20 Probenvolumen: 5 µl n
- Auswertung:
  - a. "optisch" unter der UV-Lampe
  - b. mit Scanner der Fa. Camag und Auswertesoftware
  - c. Fotografie

## 25 c.) HPLC mit UV-Detektion (konjugierte Gallensäuren)

- Geräte: HPLC-Anlage der Fa. Kontron, bestehend aus drei Pumpen und Mischkammer, Autosampler, UV-Detektor und Auswerteeinheit mit Software MT2.
- Mobile Phase: Laufmittel A: Ammoniumcarbamatpuffer 0,019 M, mit Phosphorsäure auf pH 4,0 eingestellt. Laufmittel B: Acetonitril
- 30 Säule: ®LiChrospher 100 RP-8, 25 mm, 5 µm von Merck
- Vorsäule: LiChrospher 60 RP-select B, 4 mm, 5 µm von Merck
- Flußrate:
- Gradient:

35	<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="padding: 2px;">0,00 min</td><td style="padding: 2px;">0,8 ml/min</td></tr> <tr> <td style="padding: 2px;">20,00 min</td><td style="padding: 2px;">0,8 ml/min</td></tr> <tr> <td style="padding: 2px;">23,00 min</td><td style="padding: 2px;">1,3 ml/min</td></tr> <tr> <td style="padding: 2px;">51,00 min</td><td style="padding: 2px;">1,3 ml/min</td></tr> </table>	0,00 min	0,8 ml/min	20,00 min	0,8 ml/min	23,00 min	1,3 ml/min	51,00 min	1,3 ml/min
0,00 min	0,8 ml/min								
20,00 min	0,8 ml/min								
23,00 min	1,3 ml/min								
51,00 min	1,3 ml/min								
40									

- Detektion: 200 nm (für Präparate zusätzlich bei 254 nm)
- Gradient:

45	<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="padding: 2px;">0,00 min</td><td style="padding: 2px;">32 % B</td></tr> <tr> <td style="padding: 2px;">8,00 min</td><td style="padding: 2px;">35 % B</td></tr> <tr> <td style="padding: 2px;">17,00 min</td><td style="padding: 2px;">38 % B</td></tr> <tr> <td style="padding: 2px;">20,00 min</td><td style="padding: 2px;">40 % B</td></tr> <tr> <td style="padding: 2px;">24,00 min</td><td style="padding: 2px;">40 % B</td></tr> <tr> <td style="padding: 2px;">30,00 min</td><td style="padding: 2px;">50 % B</td></tr> <tr> <td style="padding: 2px;">45,00 min</td><td style="padding: 2px;">60 % B</td></tr> </table>	0,00 min	32 % B	8,00 min	35 % B	17,00 min	38 % B	20,00 min	40 % B	24,00 min	40 % B	30,00 min	50 % B	45,00 min	60 % B
0,00 min	32 % B														
8,00 min	35 % B														
17,00 min	38 % B														
20,00 min	40 % B														
24,00 min	40 % B														
30,00 min	50 % B														
45,00 min	60 % B														
50															

## 55 d.) Derivatisierung, HPLC mit Fluoreszenzdetektion (unkonjugierte und glycinkonjugierte Gallensäuren)

- Geräte: HPLC-Anlage der Fa. Kontron, bestehend aus drei Pumpen und Mischkammer, Autosampler, UV-Detektor und Auswerteeinheit mit Software MT2. Fluoreszenzdetektor

von Merck-Hitachi. Da die Proben licht- und temperaturempfindlich sind, wird der Autosampler auf ca. 5 °C gekühlt.

Mobile-Phase: Laufmittel A: Millipore-Wasser (eigene Anlage) Laufmittel B: Acetonitril/Methanol 60:30

Säule: LiChrospher 100 RP-18, 25 mm, 5 µm von Merck

5 Vorsäule: LiChrospher 60 RP-select B, 4 mm, 5 µm von Merck

Flußrate: 1,3 ml/min

Detektion: Excitation: 340 nm

Emission: 410 nm

Gradient:

10

0,00 min	66 % B
7,50 min	66 % B
8,00 min	76 % B
12,50 min	76 % B
13,00 min	83 % B
25,00 min	83 % B
25,50 min	91 % B
40,00 min	91 % B

15

20

#### e.) HPLC (Cholesterin)

Geräte: HPLC-Anlage der Fa. Kontron, bestehend aus drei Pumpen und Mischkammer, Autosampler, UV-Detektor und Auswerteeinheit mit Software MT2.

25

Mobile Phase: Acetonitril : Isopropanol 50:50

Säule: LiChrospher 100 RP-18, 25 mm, 5 µm von Merck

Vorsäule: LiChrospher 60 RP-select B, 4 mm, 5 µm von Merck

Flußrate: 1,0 ml/min

30

Detektion: 207 nm

#### f.) "optisch" (Gallenfarbstoff)

#### 1.2 Reversibilitätsprüfung

35

Das bei einem Ansatz wie oben beschrieben aus dem Gleichgewicht entfernte Adsorbat wurde mit frischem gallensäurefreien Medium, z.B. Wasser oder Phosphatpuffer, nachinkubiert und wie oben bestimmt.

#### 40 Patentansprüche

1. Unvernetzte alkylierte Polyethylenimine herstellbar aus einem Ausgangspolyethylenimin mit einem Molekulargewicht von 10 000 bis 10 000 000 und einem Alkylierungsmittel, dadurch gekennzeichnet, daß das Alkylierungsmittel die allgemeine Formel I besitzt

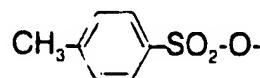
45

R - X (I)

worin

50 R ein Cycloalkylrest mit 5-30 Kohlenstoffatomen bedeutet und

X Chlor, Brom, Jod,  $\text{CH}_3\text{-SO}_2\text{-O-}$  oder



bedeutet.

2. Polyethylenimine nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß der Cycloalkylrest mono-, bi-, tricyclisch oder polycyclisch ist und/oder verbrückt ist.
3. Polyethylenimine nach den Ansprüchen 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß
  - 5 R Cyclopentyl, Cyclohexyl, Cycloheptyl, Cyclooctyl, Cyclononyl, Cyclodecyl, Decalyl, Hydrindanyl, Norbornyl oder Cyclopentanoperhydrophenanthren und deren Derivate ist.
4. Polyethylenimine nach den Ansprüchen 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß das Ausgangspolyethylenimin ein Molekulargewicht von größer als 100 000 aufweist.
- 10 5. Verfahren zur Herstellung von unvernetzten alkylierten Polyethyleniminderivaten, dadurch gekennzeichnet, daß man nach in der Polymerchemie üblichen Methoden ein Ausgangspolyethylenimin mit einem Molekulargewicht von 10 000 bis 10 000 000 mit einem Alkylierungsmittel der Formel I gemäß Anspruch 1 alkyliert.
- 15 6. Verfahren nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß eine oder mehrere der folgenden Maßnahmen eingehalten werden:
  - a) Polyethylenimine mit einem Molekulargewichtsbereich über 100 000 eingesetzt werden,
  - b) in den Alkylierungsmitteln R-X, X Chlor oder Brom ist,
  - 20 c) in den Alkylierungsmitteln R ein cyclischer Alkylrest ist,
  - d) das Verhältnis des eingesetzten Alkylierungsmittels zu den Aminogruppen des Polyethylenimins 0,5 : 1 bis 2 : 1 beträgt.
- 25 7. Pharmazeutisches Präparat, dadurch gekennzeichnet, daß es eine Verbindung gemäß den Ansprüchen 1 bis 4 oder deren physiologisch verträgliches Salz mit einer Säure enthält.
8. Verfahren zur Herstellung eines pharmazeutischen Präparates, dadurch gekennzeichnet, daß man eine Verbindung gemäß den Ansprüchen 1 bis 4 in eine geeignete Darreichungsform überführt.
- 30 9. Verwendung einer Verbindung gemäß den Ansprüchen 1 bis 4 als Hypolipidämikum.
10. Verwendung von Verbindungen gemäß den Ansprüchen 1 bis 4 als Zusatz in Lebensmitteln und Fruchtsäften.

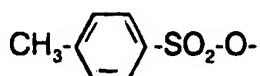
35 **Patentansprüche für folgende Vertragsstaaten : ES, GR**

1. Verfahren zur Herstellung von unvernetzten, alkylierten Polyethyleniminen, dadurch gekennzeichnet, daß man ein Ausgangspolyethylenimin mit einem Molekulargewicht von 10 000 bis 10 000 000 mit einem Alkylierungsmittel, der Formel I

40 R - X (I)

worin

45 R ein Cycloalkylrest mit 5-30 Kohlenstoffatomen bedeutet und  
 X Chlor, Brom, Jod,  $\text{CH}_2\text{-SO}_2\text{-O-}$  oder



bedeutet, nach in der Polymerchemie üblichen Methoden alkyliert.

2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß man eine Verbindung I, worin der Cycloalkylrest mono-, bi-, tricyclisch oder polycyclisch ist und/oder verbrückt ist, verwendet.
- 55 3. Verfahren nach den Ansprüchen 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß man ein Alkylierungsmittel der Formel I, worin

R Cyclopentyl, Cyclohexyl, Cycloheptyl, Cyclooctyl, Cyclononyl, Cyclodecanyl, Decanyl, Hydrindanoyl, Norbornyl oder Cyclopentanoperhydrophenanthren und deren Derivate ist, verwendet.

4. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß eine oder mehrere der folgenden Maßnahmen eingehalten werden:
  - 5 a) Polyethylenimine mit einem Molekulargewichtsbereich über 100 000 eingesetzt werden,
  - b) in den Alkylierungsmitteln R-X, X Chlor oder Brom ist,
  - c) in den Alkylierungsmitteln R ein cyclischer Alkylrest ist,
  - d) das Verhältnis des eingesetzten Alkylierungsmittels zu den Aminogruppen des Polyethylenimins 10 0,5 : 1 bis 2: 1 beträgt.
5. Verfahren zur Herstellung eines pharmazeutischen Präparates, dadurch gekennzeichnet, daß man eine Verbindung erhältlich nach Verfahren der Ansprüchen 1 bis 4 in eine geeignete Darreichungsform überführt.

15

20

25

30

35

40

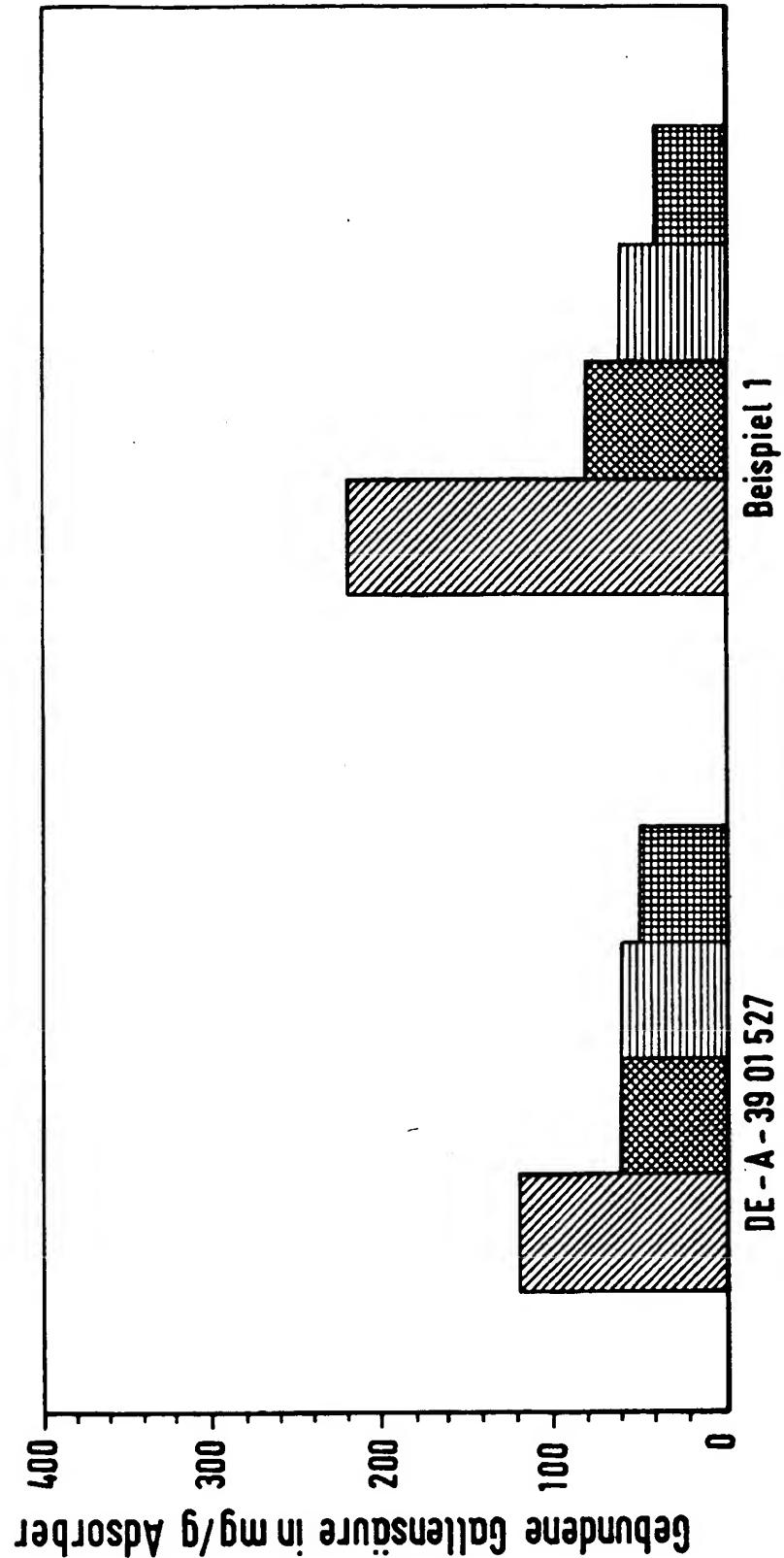
45

50

55

**Fig. 1** ADSORBER IN RINDERGALLE  
HPLC - Analyse, UV - Detektion

Glyco-  
cholat  
Tauro-  
cholat  
Sonstige  
Gallensäure  
Chole-  
sterin



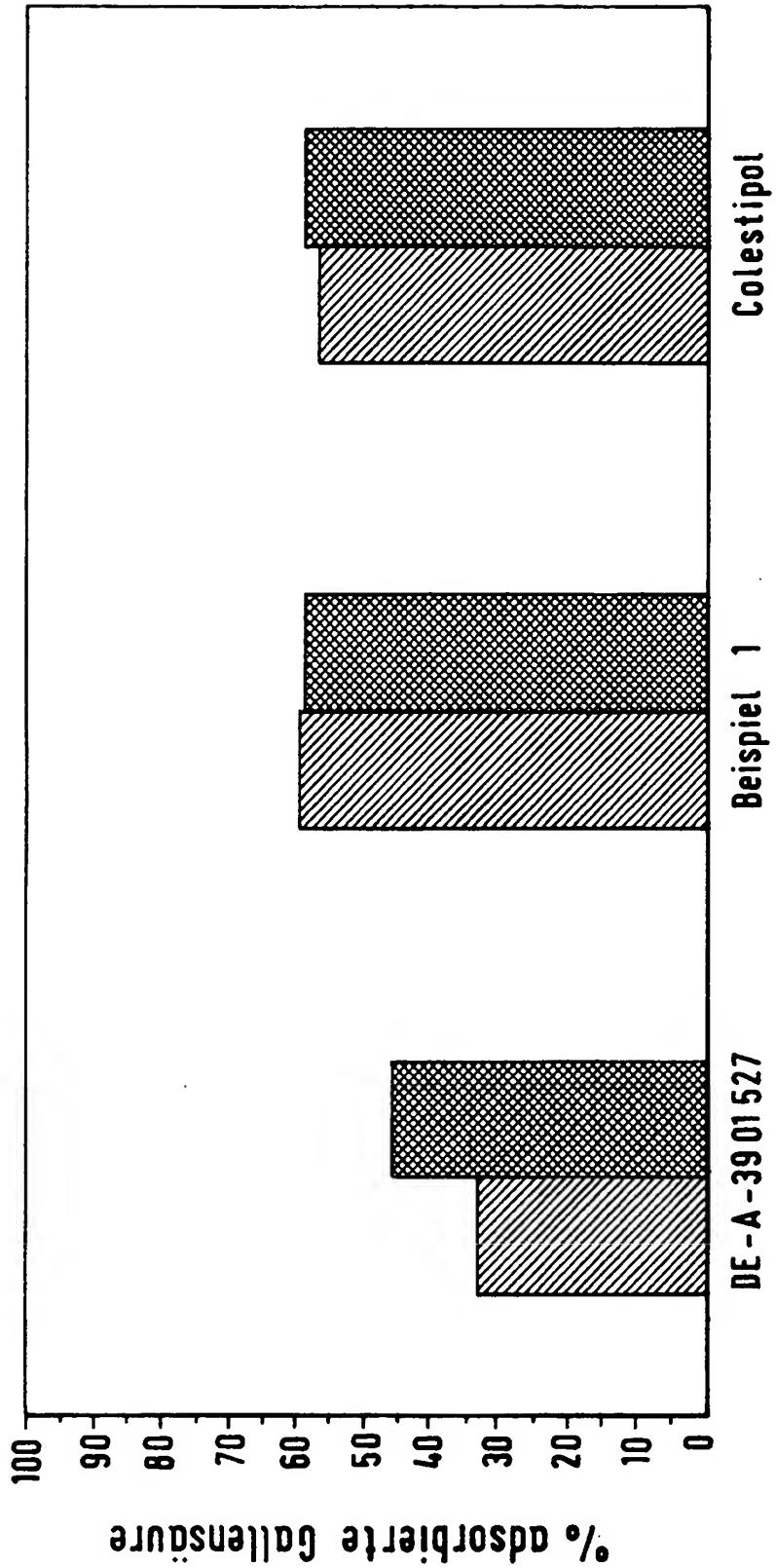
Beispiel 1  
DE - A - 39 01 527

***Fig. 2*** **ADSORBER IN RINDERGALLE**  
HPLC - Analyse, UV - Detektion

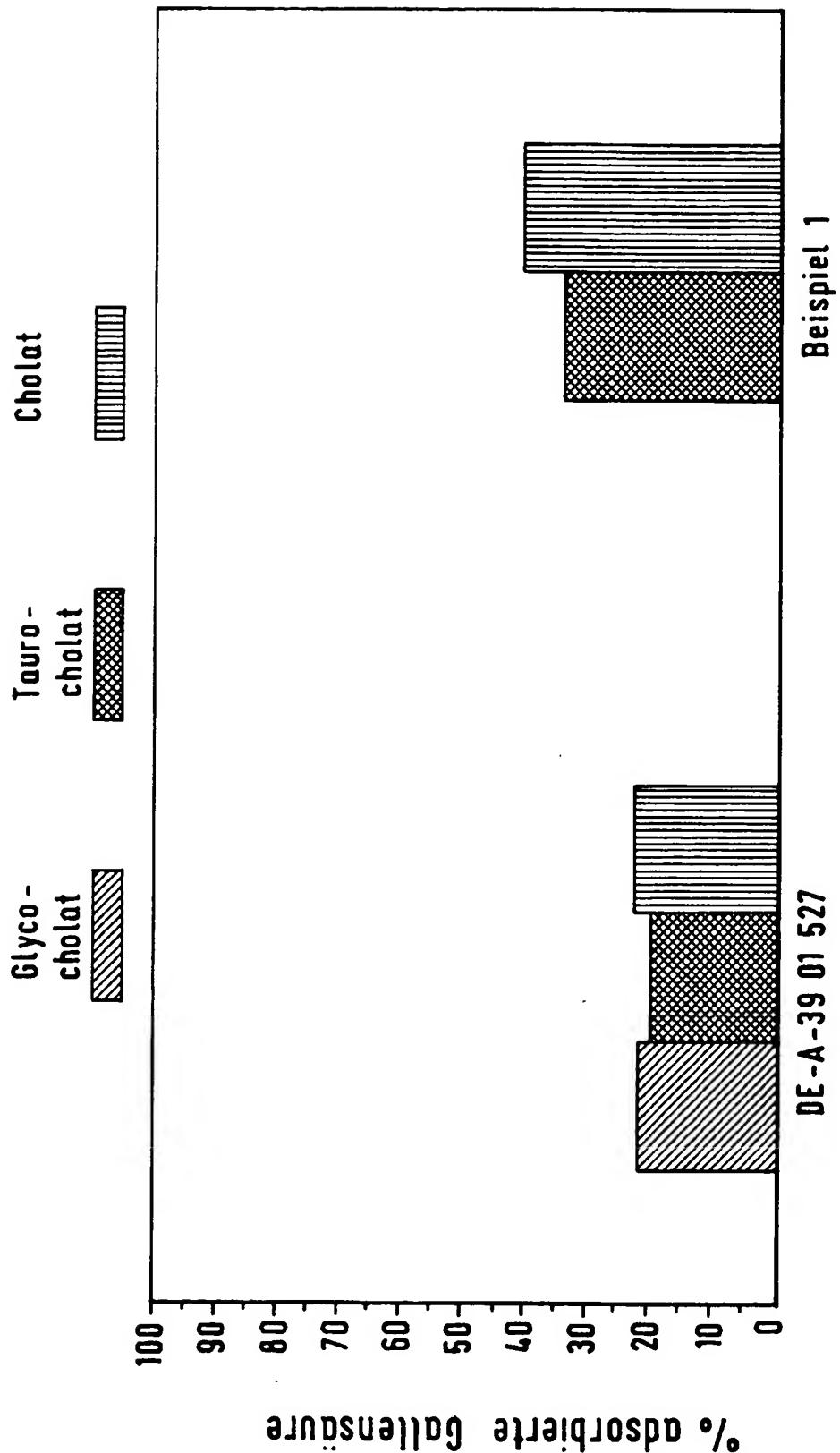
Glyco -  
cholat



Tauro -  
cholat



**Fig. 3** ADSORBER IN RINDERGALLE  
TLC-Analyse, Auswertung mit Scanner

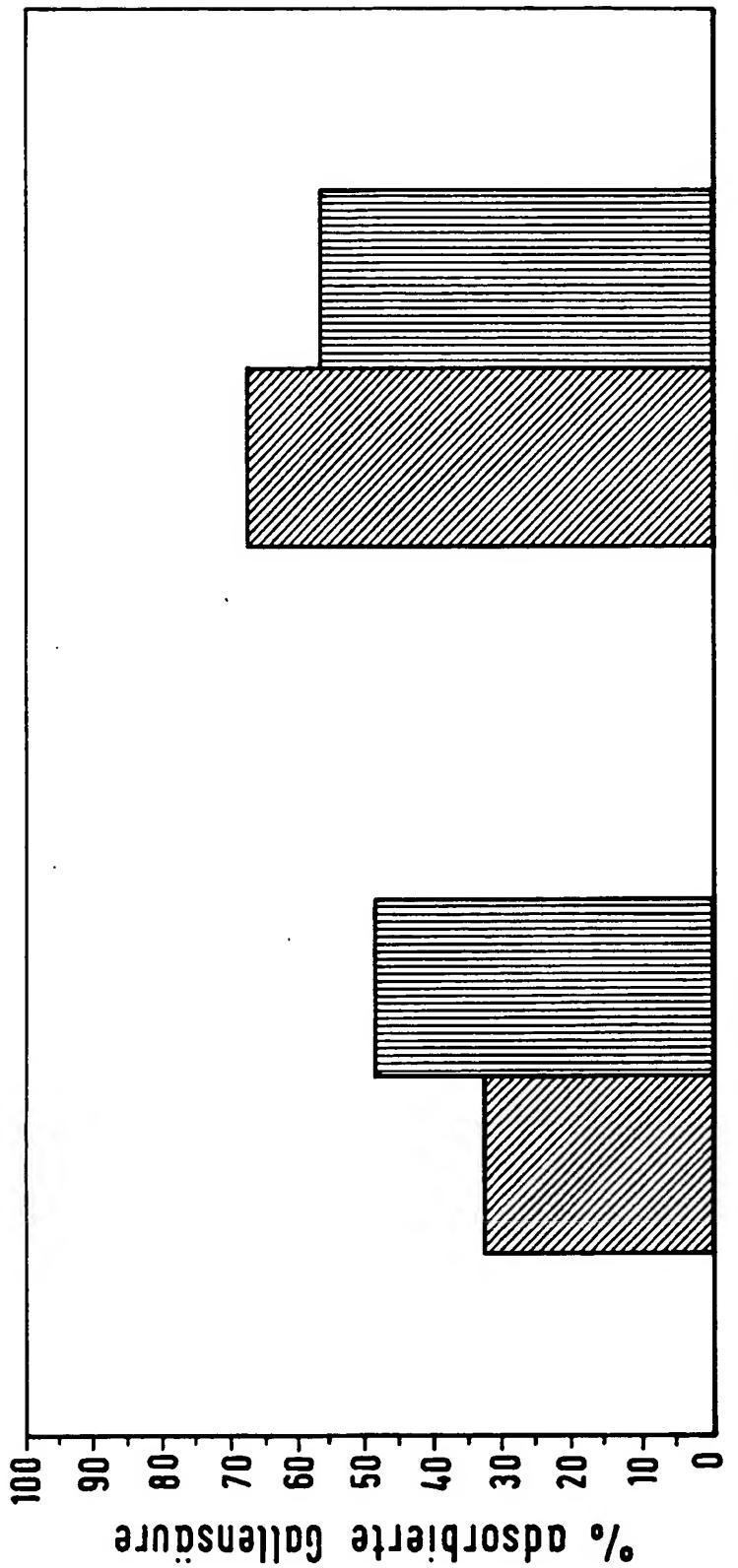


**Fig. 4. ABSORBER IN RINDERGALLE**  
HPLC-Analyse, Fluoreszenzdetektion

Cholat



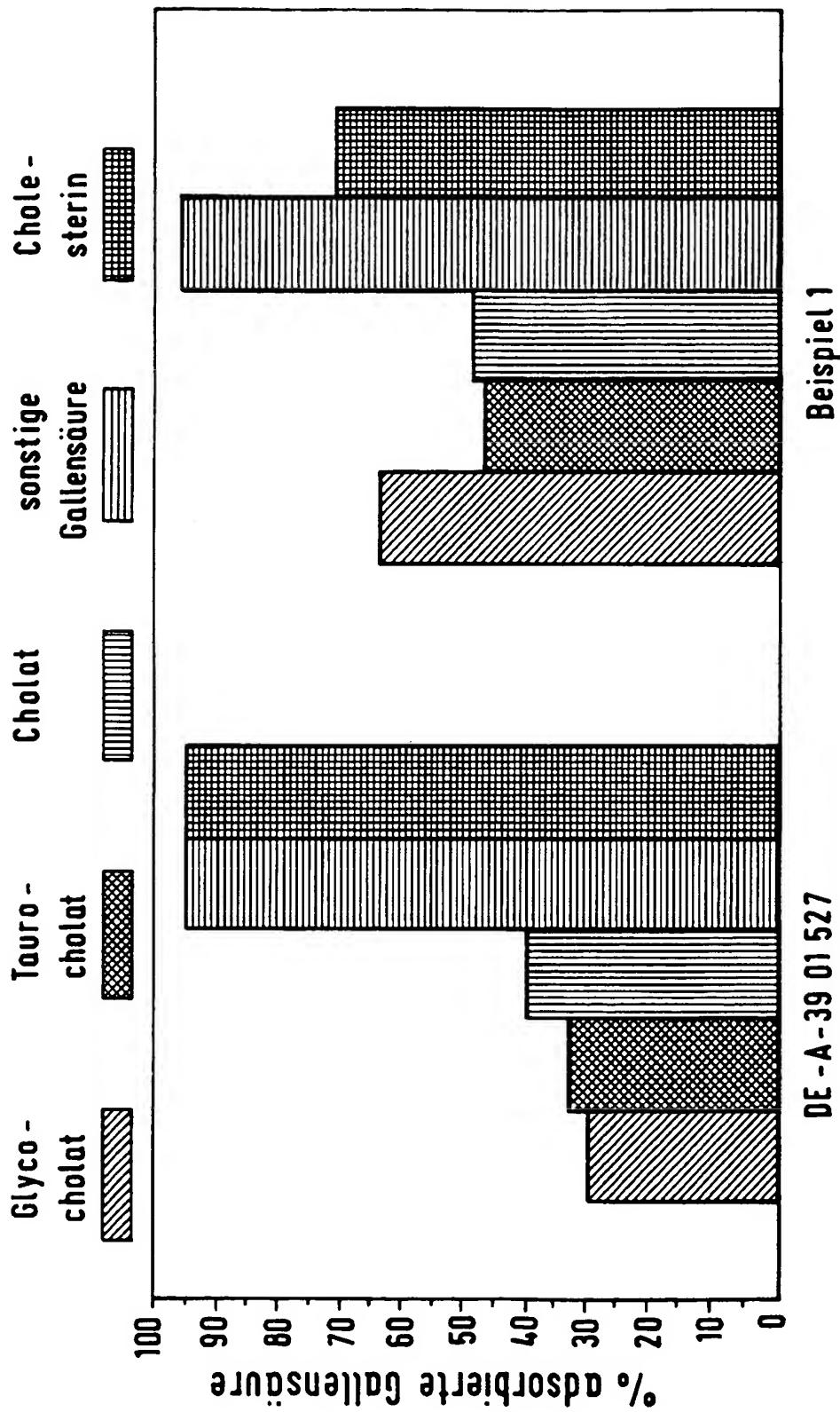
Glyco-  
cholat



Beispiel 1

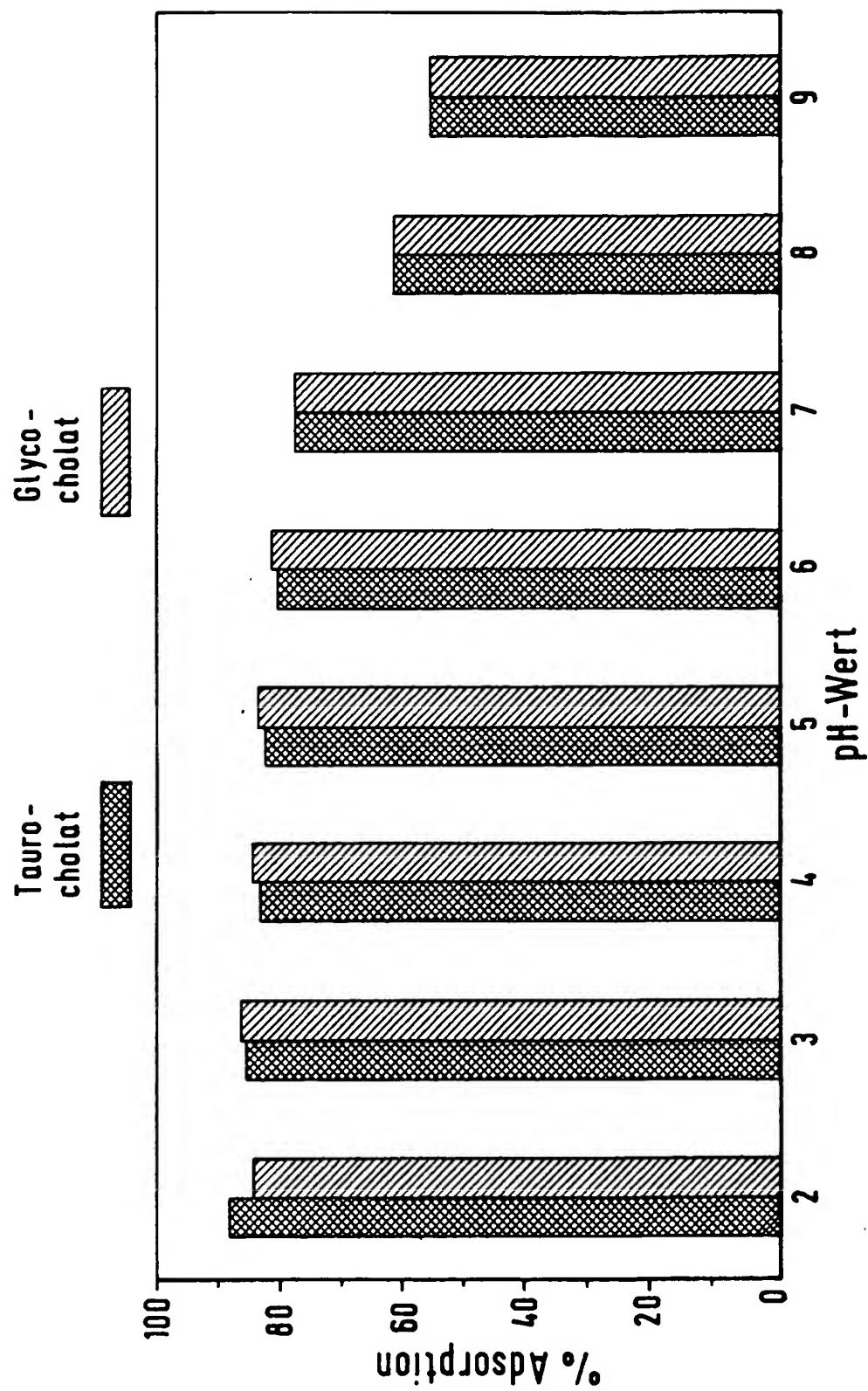
DE-A-39 01 527

**Fig. 5**  
**ADSORBER IN RINDERGALLE**  
 Mittelwerte aller Analysen



DE-A-39 01 527

Beispiel 1

**Fig. 6** pH-Abhangigkeit der Gallensäure-Adsorption



EINSCHLÄGIGE DOKUMENTE			KLASSIFIKATION DER ANMELDUNG (Int. CL.5)						
Kategorie	Kennzeichnung des Dokuments mit Angabe, soweit erforderlich, der maßgeblichen Teile	Betrieft Anspruch							
D, Y	EP-A-0 379 161 (HOECHST) * das ganze Dokument * ---	1-10	A61K31/785 C08G73/04						
D, Y	US-A-3 332 841 (C. AINSWORTH) * das ganze Dokument * ---	1-10							
Y	US-A-3 454 380 (W. J. DICKSON) * Spalte 19, Zeile 45 - Zeile 72 * * Tabelle VI * -----	1-10							
			RECHERCHIERTE SACHGEBiete (Int. Cl.5)						
			A61K C08G						
<p>Der vorliegende Recherchenbericht wurde für alle Patentansprüche erstellt</p> <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width: 33%;">Recherchenort</td> <td style="width: 33%;">Abschlußdatum der Recherche</td> <td style="width: 34%;">Prüfer</td> </tr> <tr> <td>DEN HAAG</td> <td>25 NOVEMBER 1992</td> <td>SCARPONI U.</td> </tr> </table> <p><b>KATEGORIE DER GENANNTEN DOKUMENTE</b></p> <p>X : von besonderer Bedeutung allein betrachtet    Y : von besonderer Bedeutung in Verbindung mit einer anderen Veröffentlichung derselben Kategorie    A : technologischer Hintergrund    O : nichtschriftliche Offenbarung    P : Zwischenliteratur</p> <p>T : der Erfindung zugrunde liegende Theorien oder Grundsätze    E : älteres Patentdokument, das jedoch erst am oder nach dem Anmeldedatum veröffentlicht worden ist    D : in der Anmeldung angeführtes Dokument    L : aus andern Gründen angeführtes Dokument    &amp; : Mitglied der gleichen Patentfamilie, übereinstimmendes Dokument</p>				Recherchenort	Abschlußdatum der Recherche	Prüfer	DEN HAAG	25 NOVEMBER 1992	SCARPONI U.
Recherchenort	Abschlußdatum der Recherche	Prüfer							
DEN HAAG	25 NOVEMBER 1992	SCARPONI U.							